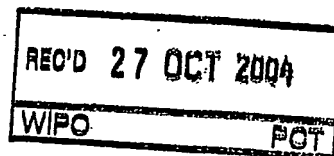




E104/10230



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 51 471.6
Anmeldetag: 04. November 2003
Anmelder/Inhaber: Professor Dr. Ursula
Wiedermann-Schmidt, Wien/AT
Bezeichnung: Polyvalente Allergievakzine
IPC: C 07 K, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 14. Oktober 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Schmidt O.

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

Polyvalente Allergievakzine

Beschreibung

Die Erfindung betrifft neue Polypeptide, die insbesondere geeignet sind, verschiedene Allergien gleichzeitig behandeln zu können. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung eine Verwendung der Polypeptide zur Herstellung einer Vakzine zur Behandlung allergischer Erkrankungen.

Typ 1 Allergie ist die Bezeichnung für den Zustand einer immunologisch bedingten Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp gegen Substanzen (Allergene), gegen die normalerweise keine Sensibilisierung vorliegt.

Es werden vier Typen von Überempfindlichkeitsreaktionen unterschieden, von denen Typ I-III durch Antikörper mediiert werden und nur die Typ IV Reaktion von sensibilisierten T-Zellen ausgelöst wird.

Die Typ I Reaktion, oder auch Hypersensibilitätsreaktion vom Soforttyp, wird durch IgE Antikörper vermittelt. Im Rahmen der Sensibilisierungsphase mit Allergenen werden spezifische IgE Antikörper von B-Zellen gebildet, die vor allem unter dem Einfluss von Botenstoffen von T-Helfer 2 Zellen (Interleukin 4, 5, 13) entstehen. Beim Allergiker besteht eine genetische Neigung diese Botenstoffe – Zytokine – in einem Übermaß zu produzieren, wodurch dann auch eine übermäßig hohe Konzentration an IgE Antikörpern entstehen kann. Diese IgE Antikörper werden dann an Mastzellen und Basophilen an die Fc-ε Rezeptoren gebunden.

Bei einem erneuten Kontakt mit dem/den Allergenen werden die Allergene an die mastzellständigen IgE gebunden und führen zu einer Kreuzvernetzung der IgE-Antikörper, wodurch es zur Degranulierung der Mastzellen und Basophilen mit Ausschüttung von vasoaktiven Substanzen (Histamin, Leukotriene etc.) kommt. Dadurch kommt es zu den typischen allergischen Symptomen, die von Heuschnupfen über Konjunktivitis, Asthma bronchiale bis hin zum anaphylaktischen Schock reichen können.

Zu den wichtigsten Aeroallergenen (es gibt natürlich auch Nahrungsmittelallergene, die aber viel seltener zu allergischen

Erkrankungen führen wie Inhalationsallergene) gehören Baum- und Gräserpollen, Tierhaare- und Proteine, Hausstaubmilben, Latexallergene etc.

Etwa 20 % der Bevölkerung leidet an Typ I Allergien, wobei ein Grossteil der Betroffenen nicht nur gegen ein Allergen, sondern gegen verschieden Allergene gleichzeitig sensibilisiert ist ("Poly-Allergiker").

Die Therapie der Wahl (und einzige kausale Behandlung) ist die spezifische Immuntherapie, kurz SIT. Dabei werden in steigender Dosierung Allergenextrakte dem Patienten gespritzt, damit dieser hyposensibilisiert wird, sprich geringer bis gar nicht auf das jeweilige Allergen reagiert. Diese Form der Behandlung kann zwar sehr erfolgreich sein, allerdings vor allem dann, wenn es sich um junge und monosensibilisierte Personen handelt, d.h. Patienten, die bevorzugt nur auf ein Allergen allergisch sind. Weitere Nachteile dieser Behandlung sind, dass die Behandlung mehrere Jahre dauert, dass es manchmal zu anaphylaktischen Nebenwirkungen kommen kann, und dass die Behandlung durch Spritzen erfolgt, wovon sehr viele Patienten - besonders Kinder - eine große Abneigung zeigen.

Des weiteren ist zu beachten, dass derzeit nach den internationalen Richtlinien zur Immuntherapie von der Behandlung Polysensibilisierter ausdrücklich abgeraten wird, vor allem wegen zu geringem Behandlungserfolg und gesteigertem Risiko für anaphylaktische Nebenreaktionen während der Behandlung.

Durch zahlreiche Publikationen (Wiedermann U et al, 1999; J. Allergy Clin Immunol; 103: p 93; Garside P, 1999 Gut; 44: p 137; Lowrey J et al 1998; Int. Arch. Allergy Immunol; 116: 93.) ist bekannt, dass durch die mukosale Applikation von einem rekombinanten Allergen die allergische Sensibilisierung mit dem selben Allergen verhindert werden kann - es kann also erfolgreich eine Prophylaxe wie auch eine Therapie gegen eine Allergie erzielt werden.

Des weiteren wird versucht, eine Behandlung von Allergien durch die Induktion von sogenannten blockierenden Antikörpern (meist IgG) zu erreichen. Diese blockierenden Antikörper sollen das jeweilige

Antigen/Allergen abfangen damit es nicht mehr an mastzellständige IgE-Antikörper binden kann. Zur Induktion dieser IgG-Antikörper werden zumeist B-Zellepitope, oder Konstrukte, die diese enthalten, herangezogen.

Aus EP 1 219 301 ist bekannt, dass Hybridallergene zur Behandlung als auch zur Diagnose von Allergien Verwendung finden können. Dabei wird vorgeschlagen, verschiedene Proteine oder Fragmente von Proteinen zu hybridisieren und diese Hybridmoleküle zur Herstellung von Vakzinen zu verwenden. Immunisierung mit diesen Hybridmolekülen führt zur Bildung von blockierenden IgE-Antikörper. Diese Hybridmoleküle sind aus Allergenen einer einzigen Allergenquelle aufgebaut und die gebildeten Antikörper sind folglich nur gegen ein bestimmtes Allergen gerichtet.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, neue Polypeptide bereitzustellen, die es erlauben, mehrere Allergien behandeln zu können.

Des weiteren ist es Aufgabe der Erfindung, Polypeptide bereitzustellen, die es erlauben, mehrere Allergien gleichzeitig, insbesondere Allergien, die durch nicht kreuzreagierenden Allergene ausgelöst werden, behandeln zu können.

Darüber hinaus ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung bevorzugt über die Schleimhaut eine Prophylaxe und/oder Therapie gegen mehrere Allergien gleichzeitig durchführen zu können.

Der Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, daß dies durch neuartige Hybridpolypeptide und/oder Chimärantigene erreicht werden kann.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Hybridpolypeptid gelöst, welches eine Vielzahl von immundominanten T-Zell-Epitopen von Allergenen umfasst, wobei zumindest zwei von den Allergenen nicht miteinander kreuzreagieren.

Eine bekannte Vorgehensweise bei der Behandlung von Allergikern ist es, wie oben erwähnt, die Induktion von blockierenden Antikörpern zu erreichen.

Das Grundkonzept der vorliegenden Erfindung liegt dagegen darin, dass die Hybridpolypeptide, die immundominante T-Zell-Epitope von verschiedenen

Allergenen umfassen, bei mukosaler Applikation zu einer antigen-spezifischen Nichtreaktivität führen, d.h. eine mukosale Toleranz bewirken, die durch Deletion, Anergie von Antigen/Allergen-spezifischen T-Zellen durch die Produktion von suppressiv-wirksamen Zytokinen von sogenannten regulatorischen T-Zellen oder durch Immunmodulation ($Th_1 > Th_2$ -Zellen) erreicht wird. Durch das Fehlen der notwendigen Zytokine wird in der Folge auch die Bildung von antigen-spezifischen Antikörpern unterbunden. Es wird somit eine Unterdrückung der unerwünschten Immunantworten gegen die jeweiligen Allergene erreicht.

Dabei wird unter einem Hybridpolypeptid ein Polypeptid verstanden, das eine Vielzahl von immundominanten T-Zell-Epitope aufweist. Es ist bevorzugt, daß das Hybridpolypeptid aus zumindest fünf immundominanten T-Zell-Epitopen, mehr bevorzugt aus zumindest vier immundominanten T-Zell-Epitopen und am meisten bevorzugt aus zumindest drei immundominanten T-Zell-Epitopen besteht. Bevorzugt ist des weiteren, daß das Hybridpolypeptid nur aus T-Zell-Epitopen besteht.

Unter einem Allergen versteht man eine normalerweise harmlose Substanz, die befähigt ist in einem Allergiker bzw. Atopiker die Bildung von IgE Antikörpern zu induzieren und bei erneutem Kontakt allergische Symptome vom Soforttyp (Rhinitis, Konjunktivitis, Asthma etc) auszulösen. Es handelt sich dabei um ganze Proteine oder Proteinfragmente bzw. Peptide von unterschiedlich langer Aminosäuresequenz.

Unter Epitop versteht man eine bestimmte Region am oder im Protein – meist von 10-20 Aminosäuren Länge, die entweder von spezifischen Immunglobulinen (Antikörpern) von B-Zellen erkannt werden kann und/oder von T-Zellen (bzw. deren spezifischen T-Zellrezeptoren) erkannt werden. In der Regel erkennen Antikörper Epitope auf der Tertiärstruktur von Proteinen, sie werden daher B-Zellepitope genannt. Diese B-Zellepitope entsprechen entweder sogenannten Konformationsepitopen oder linearen Epitopen, die an der Oberfläche gelegen sind und für Antikörper leicht zugänglich sind. Im Unterschied dazu sind die T-Zellepitope, die von den T-Zellrezeptoren von spezifischen T-Zellen erkannt werden, immer linear Epitope und nicht nur an der Oberfläche des Moleküls gelegen, sondern können beliebig innerhalb der gesamten Sequenz des Moleküls verteilt liegen. Die T-Zellepitope werden erst dann für T-Zellen zugänglich, wenn das Allergen von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen wurde,

prozessiert und mittels MHC-Klasse II Molekülen an die T-Zellen bzw. deren T-Zellrezeptor dargereicht wurde.

Zu meist haben B-Zellepitope und T-Zellepitope unterschiedliche Lokalisationen innerhalb des Moleküls, und daher werden T-Zellepitope (in der Regel) nicht von Antikörpern erkannt oder gebunden. Das bedeutet, wenn man einen Allergiker, der bereits spezifische Antikörper gebildet hat, mit einer Substanz behandelt, die ein T-Zellepitop darstellt, dann besteht nicht die Gefahr, dass diese T-Zellepitope von den Antikörpern gebunden werden. Daher besteht auch nicht die Gefahr für anaphylaktische Reaktionen während der Behandlung. (Dies ist nicht der Fall, wenn die behandelnde Substanz ein B-Zellepitop darstellt oder enthält).

Eine weitere Bedingung ist, daß T-Zell-Epitope von mindestens zwei Allergenen verwendet werden, die nicht miteinander kreuzreagieren. Eine Kreuzreaktion tritt z.B. auf als Reaktion auf Antigene verwandter Bakterien, wenn bestimmte Untereinheiten innerhalb ihres "Antigenmosaiks" identisch sind. Gleiches kann sich bei Eiweißkörpern verwandter Tierarten und bei künstlich konjugierten Antigenen (mit Strukturähnlichkeiten der angekoppelten Haptene) ereignen.

Ein Vorteil von Hybridpolypeptiden aus T-Zell-Epitopen, die nicht miteinander kreuzreagieren, besteht darin, daß diese geeignet sind, mehrere Allergien, die nicht in ihrem Antigenmosaik identisch sind, gleichzeitig behandeln zu können.

Es ist bevorzugt, daß alle T-Zell-Epitope des Hybridpolypeptids von Allergenen stammen, die nicht miteinander kreuzreagieren. Dadurch besteht die Möglichkeit, eine Behandlung von Multi- oder Polyallergikern durchzuführen.

Es ist insbesondere bevorzugt, daß die verwendeten T-Zell-Epitope aus der Reihe der Baumpollenallergene, insbesondere Birkenallergene, bevorzugt Bet v 1, Bet v 1 Isoformen, wie beschrieben in Ferreira, F et al 1997, Int. Arch Allergy Immunol: 113;125 und Bet v 1 Mutante, wie beschrieben in Ferreira F. et al 1998 FASEB:12:231, Gräserpollenallergene (bevorzugt Phlp 1, Phlp 2, Phlp 5, Phlp 6), Latexallergene (bevorzugt Hev b 1, Hev b 2, Hev b 3, Hev b 5, Hev b 6, Hev b 7, Hev b 8, Hev b 9, Hev b 10) und Tierallergene ausgewählt werden.

Es ist besonders bevorzugt, daß die Tierallergene Tierhaare (bevorzugt Fel d 1) und/oder Hausstaubmilbenallergenen (bevorzugt Der p 1, Der p 2, Der f 1, Der f 2) sind.

Es ist insbesondere bevorzugt, daß es sich bei dem Hybridpolypeptid um ein Hybridpolypeptid handelt, daß die T-Zell-Epitope von Gräserpollenallergenen (Phlp 1, Phlp 2, Phlp 5, Phlp 6) und/oder Tierallergenen, insbesondere Tierhaare (bevorzugt Fel d 1) und/oder Hausstaubmilbenallergenen (bevorzugt Der p 1, Der p 2, Der f 1, Der f 2), und/oder Baumpollenallergene, insbesondere Birkenpollenallergenen (bevorzugt Bet v 1, Bet v 1 von Isoform oder Bet v 1 von Mutanten) umfaßt.

Es ist noch mehr bevorzugt, daß das Hybridpolypeptid ein Hybrid ist, daß die T-Zell-Epitope von einem Graspollenallergen (bevorzugt Phlp 1, Phlp 2, Phlp 5, Phlp 6), von einem Baumpollenallergen, insbesondere Birkenpollenallergen (bevorzugt Bet v 1 Bet v 1 von Isoformen oder Bet v 1 von Mutanten), und von einem Latexallergen (bevorzugt Hev b 1, Hev b 2, Hev b 3, Hev b 5, Hev b 6, Hev b 7, Hev b 8, Hev b 9, Hev b 10) und/oder Tierallergen umfaßt. Es ist noch mehr bevorzugt, daß das Hybridpolypeptid nur aus T-Zell-Epitopen von Gräserallergenen (bevorzugt Phlp 1, Phlp 2, Phlp 5, Phlp 6), und/oder Baumpollenallergenen, insbesondere Birkenpollenallergenen (bevorzugt Ber v 1), und/oder Latexallergenen (bevorzugt Hev b 1, Hev b 2, Hev b 3, Hev b 5, Hev b 6, Hev b 7, Hev b 8, Hev b 9, Hev b 10) und/oder Tierallergenen besteht.

Besonders bevorzugt ist das Hybridpolypeptid mit folgender Aminosäuresequenz:

MGETLLRAVESYAGELELQFRRVKCKYTVATAPEVKYTVFETALK

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß auch dadurch gelöst, daß ein Allergenchimär bereitgestellt wird, welches zumindest ein ganzes Protein und zumindest ein weiteres Allergenfragment umfaßt.

Unter einem Allergenchimär wird nach vorliegender Erfindung ein Polypeptid verstanden, welches zumindest aus einem vollständigen Protein besteht und welches durch gentechnische Herstellung zumindest ein weiteres Allergenfragment, bevorzugt zwei oder drei, in sich trägt.

Solche Allergenchimäre sind besonders gut geeignet zu Behandlung von Allergien, da sie individuell auf den Allergiker abgestimmt werden können.

Es ist besonders bevorzugt, dass das Protein und/oder die Allergenfragmente, bevorzugt Proteinfragmente, nicht miteinander kreuzreagieren. Es ist insbesondere bevorzugt, daß das Protein und die integrierten Allergenfragmente, bevorzugt Proteinfragmente, alle miteinander nicht kreuzreagieren. Der Vorteil eines solchen Allergenchimärs liegt darin, daß ein Polyallergiker gleichzeitig gegen verschiedene Allergien behandelt werden kann und zwar auch gegen solche, die nicht miteinander kreuzreagieren.

Des weiteren ist bevorzugt, daß es sich bei den Allergenfragmenten, bevorzugt Proteinfragmenten, um T-Zell-Epitope handelt. Der Vorteil eines solchen Allergenchimärs liegt darin, daß, wie oben beschrieben, nicht die Produktion von IgG-Antikörpern angeregt wird, sondern es zu einer Unterdrückung der Herstellung von IgE-Antikörpern durch Deaktivierung der Zytokinsynthese kommt. Ein weiterer Vorteil eines Allergenchimärs ist, daß es sich um ein Molekül mit Tertiärstruktur handelt, welches mit erhöhter Effizienz von Antigen-präsentierenden Zellen (z.B. Dendritenzellen, B-Zellen etc.) aufgenommen werden, prozessiert werden kann, und so die immundominanten Peptide an die spezifischen T-Zellen präsentiert werden können. Die Verwendung von Molekülen mit Tertiärstruktur bewirkt darüber hinaus, dass die tolerogene Wirkung erhöht werden kann.

Es ist insbesondere bevorzugt, daß es sich bei dem ganzen Protein im Allergenchimär um ein Protein ausgewählt aus der Gruppe der Baumpollenallergene, insbesondere Birkenallergene (bevorzugt Bet v 1, Bet v 1 von Isoformen oder Bet v 1 von Mutanten), Gräserpollenallergene (bevorzugt Phlp 1, Phlp 2, Phlp 5, Phlp 6), Latexallergene (bevorzugt Hev b 1, Hev b 2, Hev b 3, Hev b 5, Hev b 6, Hev b 7, Hev b 8, Hev b 9, Hev b 10) und Tierallergene, insbesondere Tierhaare (bevorzugt Fel d 1) und/oder Hausstaubmilbenallergenen (bevorzugt Der p 1, Der p 2, Der f 1, Der f 2), handelt. Es ist insbesondere bevorzugt, daß es sich bei dem Protein um ein Baumpollenallergen, insbesondere um ein Birkenallergen, und besonders bevorzugt um das Protein Bet v 1, Bet v 1 von Isoformen oder Bet v 1 von Mutanten handelt.

Des weiteren ist bevorzugt, daß es sich bei den Allergenfragmenten um T-Zell-Epitope, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Gräserpollenallergene (bevorzugt Phlp 1, Phlp 2, Phlp 5, Phlp 6), Latexallergene (bevorzugt Hev b 1, Hev b 2, Hev b 3, Hev b 4, Hev b 5, Hev b 6, Hev b 7, Hev b 8, Hev b 9, Hev b 10) und Tierallergene, insbesondere Tierhaare (bevorzugt Fel d 1) und/oder Hausstaubmilbenallergenen (bevorzugt Der p 1, Der p 2, Der f 1, Der f 2), handelt.

Es ist insbesondere bevorzugt, daß es sich bei den Allergenfragmenten, bevorzugt Proteinfragmenten, um T-Zell-Epitope von Gräserpollenallergene (bevorzugt Phlp 1, Phlp 2, Phlp 5, Phlp 6), und/oder Latexallergenen (bevorzugt Hev b 1, Hev b 2, Hev b 3, Hev b 5, Hev b 6, Hev b 7, Hev b 8, Hev b 9, Hev b 10) und/oder Tierallergene, insbesondere Tierhaare (bevorzugt Fel d 1) und/oder Hausstaubmilbenallergenen (bevorzugt Der p 1, Der p 2, Der f 1, Der f 2), handelt und das vollständige Protein Bet v 1, Bet v 1 von Isoformen oder Bet v 1 von Mutanten ist.

Es ist insbesondere bevorzugt, dass die Allergenchimärkonstrukte aus Bet v 1, Bet v 1 von Isoformen oder Bet v 1 von Mutanten und den immundominanten Peptiden von Phl p 1 und Phl p 5 bestehen. Folgende Konstrukte sind am meisten bevorzugt:

Konstrukt 1 (Phl p 1 – Bet v 1a – Phl p 5) - Aminosäuresequenz

MEQKLSAGELELQFRRVKCKYPEGTVKVEFGVFNYETETTSVIPAAARLK
AFILDGDNLFPAQAINIEGNGGPGTKISPEGFPFKYVKDRVDEVDHT
NFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKIVATPDGGSILKISNKYHTKGDHEVK
AEQVKASKEGETLRVESYLLAHSDAYNKLQAYAATVATAPEVKYTVFE
TALKKATAMSE

Konstrukt 2 (Phl p 5 – Bet v 1a – Phl p 1) - Aminosäuresequenz

MAYAATVATAPEVKYTVFETALKKAITAMSEEFGVFNYETETTSVIPAA
RLFKAFILDGDNLFPAQAISSVENIEGNGGPGTIKKISFPEGFPFKYVK
DRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKIVATPDGGSILKISNKY
HTKGDHEVKAEQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAYNKLQKLSA
GELELQFRRVKCKYPEGTVK

Konstrukt 3 (Bet v 1a – Phl p 1 – Phl p 5) - Aminosäuresequenz

MGEFGVFNYETETTSVIPAARLFKAFILDGDNLFPKVAPQAISSVENIEGN
GGPGTIKKISFPEGFPFKYVKDRVDEVDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKI
SNEIKIVATPDGGSILKISNKYHTKGDHEVKAEQVKASKEMGETLLRAVE
SYLLAHSDAYNKLEQKLRSAGELELQFRRVKCKYPEGTKVTSQAYAAT
VATAPEVKYTVFETALKKAITAMSE

Konstrukt 4 (Phl p 1 – Phl p 5 – Bet v 1a) - Aminosäuresequenz

MEQKLRSAGELELQFRRVKCKYPEGTKVTSQAYAATVATAPEVKYTVF
ETALKKAITAMSEEFGEFVNYETETTSVIPAARLFKAFILDGDNLFPKVAPQ
AISSVENIEGNGGPGTIKKISFPEGFPFKYVKDRVDEVDHTNFKYNYSVIE
GGPIGDTLEKISNEIKIVATPDGGSILKISNKYHTKGDHEVKAEQVKASKE
MGETLLRAVESYLLAHSDAYN

Die Erfindung umfaßt des weiteren Polynukleotide, die das Allergenchimär nach der vorliegenden Erfindung codieren. Durch die Degenerierung des genetischen Codes können verschiedene Polynukleotidmoleküle für ein einziges Allergenchimär codieren. Die Polynukleotide der vorliegenden Erfindung sind vorzugsweise ein Expressionskonstrukt um die Polypeptide nach der Expression in der Wirtszelle zu erhalten. Das Expressionskonstrukt kann weitere Komponenten enthalten, die zur Exprimierung notwendig sind und allgemeiner Stand der Technik darstellen, wie z.B. Promotorsequenzen, Gencodierungsresistenzfaktoren gegen bestimmte Antibiotika sowie ein Replikationsorigin.

Konstrukt 1 (Phl p 1 – Bet v 1a – Phl p 5) - Nukleotidsequenz

CC ATG GAG CAG AAG CTG CGC AGC GCC GGC GAG CTG GAG CTC
CAG TTC CGG CGC GTC AAG TGC AAG TAC CCG GAG GGC ACC AAG
GTG GAA TTC GGT GTT TTC AAT TAC GAA ACT GAG ACC ACC TCT
GTT ATC CCA GCA GCT CGA CTG TTC AAG GCC TTT ATC CTT GAT
GGC GAT AAT CTC TTT CCA AAG GTT GCA CCC CAA GCC ATT AGC
AGT GTT GAA AAC ATT GAA GGA AAT GGA GGG CCT GGA ACC ATT
AAG AAG ATC AGC TTT CCC GAA GGC TTC CCT TTC AAG TAC GTG
AAG GAC AGA GTT GAT GAG GTG GAC CAC ACA AAC TTC AAA TAC
AAT TAC AGC GTG ATC GAG GGC GGT CCC ATA GGC GAC ACA TGG
AGA AGA TCT CC AAC GAG ATA AAG ATA GTG GCA ACC CCT GAT
GGA GGA TCC ATC TTG AAG ATC AGC AAC AAG TAC CAC ACC AAA

GGT GAC CAT GAG GTG AAG GCA GAG CAG GTT AAG GCA AGT AAA
GAA ATG GGC GAG ACA CTT TTG AGG GCC GTT GAG AGC TAC CTC
TTG GCA CAC TCC GAT GCC TAC AAC AAG CTT CAG GCC TAC GCC
GCC ACC GTC GCC ACC GCG CCG GAG GTC AAG TAC ACT GTC TTT
GAG ACC GCA CTG AAA AAG GCC ATC ACC GCC ATG TCC GAA TAA
CTC GAG

Konstrukt 2 (Phl p 5 – Bet v 1a – Phl p 1) - Nukleotidsequenz

CC ATG GCC TAC GCC GCC ACC GTC GCC ACC GCG CCG GAG GTC
AAG TAC ACT GTC TTT GAG ACC GCA CTG AAA AAG GCC ATC ACC
GCC ATG TCC GAA GAA TTC GGT GTT TTC AAT TAC GAA ACT GAG
ACC ACC TCT GTT ATC CCA GCA GCT CGA CTG TTC AAG GCC TTT
ATC CTT GAT GGC GAT AAT CTC TTT CCA AAG GTT GCA CCC CAA
GCC ATT AGC AGT GTT GAA AAC ATT GAA GGA AAT GGA GGG CCT
GGA ACC ATT AAG AAG ATC AGC TTT CCC GAA GGC TTC CCT TTC
AAG TAC GTG AAG GAC AGA GTT GAT GAG GTG GAC CAC ACA AAC
TTC AAA TAC AAT TAC AGC GTG ATC GAG GGC GGT CCC ATA GGC
GAC ACA TGG AGA AGA TCT CC AAC GAG ATA AAG ATA GTG GCA
ACC CCT GAT GGA GGA TCC ATC TTG AAG ATC AGC AAC AAG TAC
CAC ACC AAA GGT GAC CAT GAG GTG AAG GCA GAG CAG GTT AAG
GCA AGT AAA GAA ATG GGC GAG ACA CTT TTG AGG GCC GTT GAG
AGC TAC CTC TTG GCA CAC TCC GAT GCC TAC AAC AAG CTT GAG
CAG AAG CTG CGC AGC GCC GGC GAG CTG GAG CTC CAG TTC CGG
CGC GTC AAG TGC AAG TAC CCG GAG GGC ACC AAG GTG TAA CTC
GAG

Konstrukt 3 (Bet v 1a – Phl p 1 – Phl p 5) - Nukleotidsequenz

CC ATG GGA GAA TTC GGT GTT TTC AAT TAC GAA ACT GAG ACC
ACC TCT GTT ATC CCA GCA GCT CGA CTG TTC AAG GCC TTT ATC
CTT GAT GGC GAT AAT CTC TTT CCA AAG GTT GCA CCC CAA GCC
ATT AGC AGT GTT GAA AAC ATT GAA GGA AAT GGA GGG CCT GGA
ACC ATT AAG AAG ATC AGC TTT CCC GAA GGC TTC CCT TTC AAG
TAC GTG AAG GAC AGA GTT GAT GAG GTG GAC CAC ACA AAC TTC
AAA TAC AAT TAC AGC GTG ATC GAG GGC GGT CCC ATA GGC GAC
ACA TGG AGA AGA TCT CC AAC GAG ATA AAG ATA GTG GCA ACC
CCT GAT GGA GGA TCC ATC TTG AAG ATC AGC AAC AAG TAC CAC

ACC AAA GGT GAC CAT GAG GTG AAG GCA GAG CAG GTT AAG GCA
AGT AAA GAA ATG GGC GAG ACA CTT TTG AGG GCC GTT GAG AGC
TAC CTC TTG GCA CAC TCC GAT GCC TAC AAC AAG CTT GAG CAG
AAG CTG CGC AGC GCC GGC GAG CTG GAG CTC CAG TTC CGG CGC
GTC AAG TGC AAG TAC CCG GAG GGC ACC AAG GTG ACT AGT CAG
GCC TAC GCC GCC ACC GTC GCC ACC GCG CCG GAG GTC AAG TAC
ACT GTC TTT GAG ACC GCA CTG AAA AAG GCC ATC ACC GCC ATG
TCC GAA TAA CTC GAG

Konstrukt 4 (Phl p 1 – Phl p 5 – Bet v 1a) - Nukleotidsequenz

CC ATG GAG CAG AAG CTG CGC AGC GCC GGC GAG CTG GAG CTC
CAG TTC CGG CGC GTC AAG TGC AAG TAC CCG GAG GGC ACC AAG
GTG ACT AGT CAG GCC TAC GCC GCC ACC GTC GCC ACC GCG CCG
GAG GTC AAG TAC ACT GTC TTT GAG ACC GCA CTG AAA AAG GCC
ATC ACC GCC ATG TCC GAA GAA TTC GGT GTT TTC AAT TAC GAA
ACT GAG ACC ACC TCT GTT ATC CCA GCA GCT CGA CTG TTC AAG
GCC TTT ATC CTT GAT GGC GAT AAT CTC TTT CCA AAG GTT GCA
CCC CAA GCC ATT AGC AGT GTT GAA AAC ATT GAA GGA AAT GGA
GGG CCT GGA ACC ATT AAG AAG ATC AGC TTT CCC GAA GGC TTC
CCT TTC AAG TAC GTG AAG GAC AGA GTT GAT GAG GTG GAC CAC
ACA AAC TTC AAA TAC AAT TAC AGC GTG ATC GAG GGC GGT CCC
ATA GGC GAC ACA TGG AGA AGA TCT CC AAC GAG ATA AAG ATA
GTG GCA ACC CCT GAT GGA GGA TCC ATC TTG AAG ATC AGC AAC
AAG TAC CAC ACC AAA GGT GAC CAT GAG GTG AAG GCA GAG CAG
GTT AAG GCA AGT AAA GAA ATG GGC GAG ACA CTT TTG AGG GCC
GTT GAG AGC TAC CTC TTG GCA CAC TCC GAT GCC TAC AAC TAA
CTC GAG

Des weiteren umfaßt die Erfindung eine pharmazeutische Zusammen-
setzung, die ein Hybridpolypeptid und/oder ein Allergenchimär wie oben
beschrieben, umfaßt.

Insbesondere handelt es sich um eine Vakzinzusammensetzung die
zumindest ein Hybridpolypeptid und/oder ein Allergenchimär wie oben
beschrieben, beinhaltet, welches löslich sein muß. Bei Applikation wird das
Allergenchimär in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und appliziert.

Des weiteren ist bevorzugt, daß die Zusammensetzung, die das Hybridpolypeptid und/oder das Allergenchimär wie oben beschrieben umfasst, zur Behandlung einer allergischen Erkrankung geeignet ist.

Des weiteren ist bevorzugt, daß die pharmazeutische Zusammensetzung, insbesondere Vakzine, ein mukosales Adjuvans und/oder Antigentransportsystem, wie zum Beispiel Milchsäurebakterien, umfaßt.

Bestimmte Milchsäurebakterien haben die Eigenschaft eine Th1 Immunantwort zu induzieren. Dazu ist es zweckdienlich, Milchsäurebakterien als Expressionssystem zur Herstellung von Proteinen und Peptiden zu verwenden. Als mukosale (orale) Vakzine können derartige Milchsäurebakterien die Immunantwort so beeinflussen, dass die allergischen Reaktionen verhindert oder moduliert werden können. Daher umfaßt vorzugsweise die Vakzine zusätzlich Milchsäurebakterien um die Wirkung bei Applikation von Hybridpeptiden oder Allergenchimären zu verbessern

Weiterhin umfaßt die Erfindung die Verwendung eines Hybridpolypeptids und/oder eines Allergenchimärs wie oben beschrieben zur Herstellung eines Arzneimittels, insbesondere einer Vakzine. Es ist des weiteren bevorzugt, daß die Verwendung eines Hybridpolypeptids und/oder Allergenchimärs zur Herstellung einer Vakzine zur Behandlung von Allergien dient.

Weiterhin wird bevorzugt, daß das Hybridpolypeptid und/oder das Allergenchimär wie oben beschrieben zur Herstellung einer Vakzine zur gleichzeitigen Behandlung von zumindest zwei verschiedenen Allergien verwendet wird.

Des weiteren ist bevorzugt, daß das Hybridpolypeptid und/oder das Allergenchimär zur Herstellung einer Vakzine zur gleichzeitigen Behandlung von zumindest zwei verschiedenen Allergien verwendet wird, wobei diese durch nicht miteinander kreuzreagierend Allergenen ausgelöst werden.

Insbesondere wird bevorzugt, daß bei der Verwendung der Hybridpolypeptide und/oder Allergenchimäre zur Herstellung einer Vakzine diese Hybridpolypeptide, Fragmente aufweisen, von zumindest zwei nicht miteinander kreuzreagierenden Allergenen, und/oder die Allergenchimäre

Proteine und Fragmente aufweisen, von zumindest zwei nicht miteinander kreuzreagierenden Allergenen.

Des weiteren wird bevorzugt, daß bei der Verwendung der Hybridpolypeptide und/oder Allergenchimäre zur Herstellung einer Vakzine Hybridpolypeptide nur aus Fragmenten und/oder die Allergenchimäre nur aus Proteinen und Fragmenten bestehen, die nicht miteinander kreuzreagieren.

Es ist des weiteren bevorzugt, daß bei der Verwendung der Hybridpolypeptide und/oder Allergenchimäre zur Herstellung einer Vakzine die Hybridpolypeptide bzw. die Allergenchimäre T-Zell-Epitope der Allergene aufweisen.

Des weiteren wird bevorzugt, daß bei der Verwendung von Hybridpolypeptiden und/oder Allergenchimären zur Herstellung einer Vakzine es sich bei den Allergenfragmenten um T-Zell-Epitope, ausgewählt aus der Reihe bestehend aus Gräserpollenallergenen (bevorzugt Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6), Baumpollenallergenen, insbesondere Birkenpollenallergenen (bevorzugt Bet v 1, Bet v 1 von Isoformen oder Bet v 1 von Mutanten), Latexallergenen (bevorzugt Hev b 1, Hev b 2, Hev b 3, Hev b 5, Hev b 6, Hev b 7, Hev b 8, Hev b 9, Hev b 10) und Tierallergenen, insbesondere Tierhaare (bevorzugt Fel d 1) und/oder Hausstaubmilbenallergenen (bevorzugt Der p 1, Der p 2, Der f 1, Der f 2), handelt.

Des weiteren ist bevorzugt, daß bei der Verwendung von Allergenchimären zur Herstellung einer Vakzine es sich bei dem Protein um ein Protein ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Gräserpollenallergenen (bevorzugt Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6), Baumpollenallergen, insbesondere Birkenpollenallergen (Bet v 1, Bet v 1 von Isoformen oder Bet v 1 von Mutanten), Latexallergen (bevorzugt Hev b 1, Hev b 2, Hev b 3, Hev b 5, Hev b 6, Hev b 7, Hev b 8, Hev b 9, Hev b 10) und Tierallergen, , insbesondere Tierhaare (bevorzugt Fel d 1) und/oder Hausstaubmilbenallergenen (bevorzugt Der p 1, Der p 2, Der f 1, Der f 2), handelt.

Des weiteren können Hybridpolypeptide und/oder Allergenchimäre, wie oben definiert, zur Herstellung einer Vakzine zur Behandlung von Allergien, insbesondere zur Behandlung von Allergien beruhend auf zwei nicht kreuzreagierenden Allergenen verwendet werden.

Des weiteren ist bevorzugt, dass die Hybridpolypeptide und/oder Allergenchimäre zur Herstellung einer Vakzine so verwendet werden, dass sie zur Prophylaxe und/oder Therapie von Allergien, beruhend auf mindestens zwei nicht kreuzreagierenden Allergenen, verwendet werden kann.

Des weiteren ist bevorzugt, daß die Hybridpolypeptide und/oder die Allergenchimäre zur Herstellung einer Vakzine so verwendet werden, daß die Vakzine nasal, rektal oder oral verabreicht werden kann. Es ist aber auch denkbar, dass die Hybridpolypeptide und/oder die Allergenchimäre zur Herstellung einer Vakzine so verwendet werden, dass die Vakzine zur systemischen Behandlung verwendet werden kann. Es ist allerdings bevorzugt, dass die Verabreichung nasal, rektal oder oral, insbesondere bevorzugt nasal, erfolgen kann.

Des weiteren ist bevorzugt, daß die Verwendung der pharmazeutischen Zusammensetzung, insbesondere Vakzine, ein mukosales Adjuvans und/oder Antigentransportsystem, wie zum Beispiel Milchsäurebakterien, umfaßt.

Besonders bevorzugt sind die Vakzine, die im Methodenteil beschrieben sind.

Es ist bevorzugt, daß die Vakzine eine Dosis von Hybridpolypeptid und/oder Allergenchimär zumindest von 20 µg aufweist.

Es ist des weiteren bevorzugt, dass die Vakzine so aufgebaut ist, dass sie zumindest drei mal im Abstand von einer Woche appliziert werden kann. Dabei ist allerdings bevorzugt, dass die Verabreichung nasal, rektal oder oral, insbesondere bevorzugt nasal, erfolgen kann.

Des weiteren umfaßt die Erfindung auch das Verfahren zur Herstellung von Hybridpolypeptiden und die Verfahren zur Herstellung von Allergenchimären.

Die Hybridpolypeptide werden vorzugsweise durch chemische Synthese hergestellt, insbesondere bevorzugt durch die im Methodikteil genannte Peptidsynthese.

Die Allergenchimäre werden vorzugsweise durch die Rekombinationstechnik hergestellt. Dabei werden Polynukleotide verwendet, welche für das Allergenchimär codieren, wobei diese Polynukleotide in eine Wirtszelle eingeführt werden und diese Wirtszelle unter bestimmten Bedingungen kultiviert wird, so daß das Allergenchimär exprimiert wird. Anschließend wird das Expressionsprodukt von der Zelle getrennt. Die Polynukleotide können nach bekannten Methoden hergestellt werden bzw. es ist bevorzugt, daß die PCR-Technik verwendet wird, um Polynukleotide herzustellen, die die Allergenchimäre codieren.

Die Erfindung wird des weiteren durch folgende Beispiele genauer illustriert, ist aber auf diese nicht begrenzt.

Material und Methoden

Tiere

7-Wochen alte, weibliche BALB/c-Mäuse wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) erhalten. Alle Experimente wurden von der Tierversuchskommission der Universität Wien und des Ministeriums für Entwicklung, Forschung und Kultur genehmigt.

Rekombinante Allergene, natürliche Allergenextrakte

Bet v 1, Phl p 1 und Phl 5 wurden von Biomay GmbH (Linz, Österreich) erhalten. Birkenpollen und Pollen der Phleum pratense (Wiesengras) wurden von Allergon (Välinge, Sweden) bezogen und die Extrakte davon nach Wiedermann et. al., 1999 (J. Allergy Clin. Immunol. 103:1202) hergestellt.

Synthese, Reinigung und Charakterisierung der Peptide

Die Peptide wurden synthetisiert indem eine Fmoc (9 Fluorenyl Methoxy Carbonyl) - Methode mit HBTU-[(2-(H-Benzotriazol-1-yl)1,1,3,3 Tetramethyluronium Hexafluorophosphat- Aktivierung (0.1 mmol kleine Zyklen) auf Applied Biosystems (Foster City, CA) Peptidsynthetisierer

Model 433A verwendet wurde. Vorgeladene PEG-PS (Polyethylenglycol Polyesterene-Harze (0.15-0.2 mmol/g Füllstoff; von Septide Biosystems, Warrington, UK) wurden als feste Phase benutzt um die Peptide zu bilden. Die chemischen Materialien wurden von PE Applied Biosystems erworben. Die Ankoppelung von Aminosäuren wurde durch die Messung der Leitfähigkeit mit Feedback-Regulation überwacht. Die Peptide wurden mit folgender Lösung vom Harz getrennt: 2 Stunden 250 µl destilliertes Wasser, 250 µl Triisopropylsilan (Fluka, Buchs, Schweiz), und 9.5 ml Trifluoraceticacid und in Tert-butyl-methyl-ether (Fluka, Buchs, Schweiz) gefällt. Die Identität der Peptide wurde mittels Massenspektrometrie überprüft und die Peptide wurden auf >90% Reinheit durch preparative HPLC (pichem, Graz, Österreich) gereinigt.

Herstellung/Klonierung der Allergenchimäre:

Zuerst werden Expressionsplasmide, die für Bet v 1a codierende cDNA enthalten, im Vektor pHis-Parallel 2 hergestellt (Tabelle. 1). Der pHis-Parallel 2 enthält einen T7 Promotor zur Expressionsinduktion mittels IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid), gefolgt von einem N-terminalen 6x Histidin-Tag und eine Schnittstelle für TEV (tobacco etch viral protease), mit deren Hilfe das His-Tag abgespalten werden kann. Mit Hilfe des 6x His-Tag kann das exprimierte Allergen über Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid) Agarose (Quiagen) gereinigt werden.

Als Primer werden 5a und 5b für die Konstrukte 1-3 und 5a und 5c für das Konstrukt 4 (mitendständigem Bet v 1a) verwendet. Die Primer enthalten jeweils eine Schnittstelle für den Vektor (Nco I bzw. Xho I), eine Schnittstelle, um weitere cDNA einzufügen (Eco R I bzw. Hind III), bzw. ein Stopcodon (5c) und Bet v 1a Teilsequenzen. Mittels PCR wird die cDNA con Bet v 1, die auch Start und Stop Codon enthält, amplifiziert. Nach Reinigung und dem Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (Nco I bzw. Xho I) wird das Konstrukt in den pHis-Parallel Vektor eingefügt (siehe Tabelle 1).

In weiteren Schritten werden die Phl p 1 und Phl p 5 Teilstücke mit den entsprechenden Primeren (1a-d, 2a-d, 3a-d, 4a-d), die ebenfalls Schnittstelle und Sequenzteile enthalten, amplifiziert. nach Reinigung und Enzymverdau werden die Teilstücke in den Vektor, der bereits die Bet v 1a

Sequenz enthält, eingefügt. Mit Hilfe der beiden Schnittstellen, jeweils am 3'Ende und 5'Ende, können in Zukunft beliebig unterschiedliche und beliebig viele Allergenteilstücke (z.B. immundominante Peptide von Latexallergenen, Hausstaub-, Katzenallergenen etc.) eingefügt werden.

Die so konstruierten Plasmide werden in BL21 (DE3) Zellen, einem E.Coli Stamm, transformiert, über LB-Amp (100 mg/l Ampicillin) Platten selektioniert und eine Einzelkolonie wird ausgewählt. Zur Proteinexpression wird dieser Klon in flüssigem LB-Amp Medium hochgezogen. Die Expression wird anschließend mittels 1mM IPTG induziert. Der Zellaufschluß und die Proteinreinigung über Ni-NTA erfolgen über bereits etablierte Protokolle (Quiagen).

Table 1: Primer

Construct 1: Pept 2 - Bet v 1a - Pept 4

- (1a) 5'-primer Phl p 1 fwd Nco
5' CATGCCATGGAGCAGAAGCTGCGCAGC 3'
- (1b) 3'-primer Phl p 1 rev Eco
5' ATGAATTCCACCTTGGTGCCCTCCGG 3'
- (1c) 5'-primer Phl p 5 fwd Hind
5' ACCAAGCTTCAGGCCTACGCCGCCACC 3'
- (1d) 3'-primer Phl p 5 rev Xho Stop
5' CCGCTCGAGTTATTCGGACATGGCGGTGAT 3'

Construct 2: Pept 4 - Bet v 1a - Pept 2

- (2a) 5'-primer Phl p 1 fwd Hind
ACCAAGCTTGAGCAGAAGCTGCGCAGC
- (2b) 3'-primer Phl p 1 rev Xho-Stop
5' CCGCTCGAGTTACACCTTGGTGCCCTCCGG 3'
- (2c) 5'-primer Phl p 5 fwd Nco
5' CATGCCATGGCCTACGCCGCCACCGTC 3'
- (2d) 3'-primer Phl p 5 rev Eco
5' ATGAATTCTTCGGACATGGCGGTGAT 3'

Construct 3: Bet v 1a – Pept 2 - Pept 4

- (3a) 5'-primer Phl p 1 fwd Hind
5' ACCAAGCTTGAGCAGAAGCTGCGCAGC 3'
- (3b) 3'-primer Phl p 1 rev Spe
5' GGACTAGTCACCTTGGTGCCCTCCGG 3'
- (3c) 5'-primer Phl p 5 fwd Spe
5'GGACTAGTCAGGCCTACGCCGCCACC 3'
- (3d) 3'-primer Phl p 5 rev Xho Stop
5' CCGCTCGAGTTATTCGGACATGGCGGTGAT 3'

Construct 4: Pept 2 - Pept 4 – Bet v 1a

- (4a) 5'-primer Phl p 1 fwd Nco
5' CATGCCATGGAGCAGAAGCTGCGCAGC 3'
- (4b) 3'-primer Phl p 1 rev Spe
5' GGACTAGTCACCTTGGTGCCCTCCGGG 3'
- (4c) 5'-primer Phl p 5 fwd Spe
5' GGACTAGTCAGGCCTACGCCGCCACC 3'
- (4d) 3'-primer Phl p 5 rev Eco
5' ATGAATTCTTCGGACATGGCGGTGAT 3'

Bet v 1a

- (5a) 5'-primer Bet Start Nco Eco
5' CATGCCATGGGAGAATTCGGTGTTTTCAATTACGAAACTG 3'
- (5b) 3'-primer Bet Stop Hind Xho
5' CCGCTCGAGTCCAAGCTTGTGTAGGCATCGGAGTGTG 3'
- (5c) 3'-primer Bet Stop +Stop Xho
5' CCGCTCGAGTTAGTTGTAGGCATCGGAGTG 3'

Sensibilisierung

Die Sensibilisierung wurde durch 3 Injektionen einer Mischung aus 5 µg Bet v 1, 5 µg Phl p 1 und 5 µg Phl p 5 adsorbiert an $\text{Al}(\text{OH})_3$ in einem Zeitabstand von 14 Tagen in die Bauchhöhle durchgeführt. Es wurde eine Polysensibilisierung durchgeführt (Gruppe 1, n=5). Probeentnahme und Analyse wurden sieben Tage nach der letzten Immunisierung durchgeführt.

Toleranzinduktion

Für die Toleranzinduktion wurde eine Mischung aus 3 Allergenen (je 10 µg) intranasal (i.n.) drei mal in einem Zeitabstand von sieben Tagen vor der Polysensibilisierung verabreicht (Gruppe 2, n=5). Für Peptid-induzierte Toleranz wurde eine Mischung von 5 µg Bet v 1 Peptid, 5 µg Phl p 1 Peptid und je 5 µg von beiden Phl p 5 (Gruppe 3, n=5) oder 20 µg Hybridpeptide wie oben beschrieben benutzt. Die sensibilisierten Kontrollmäuse wurden scheinbehandelt indem 30 µl von 0.9% NaCl intranasal verabreicht wurde. Probeentnahme und Analyse wurden sieben Tage nach der letzten Immunisierung durchgeführt.

Kutane Typ 1 Hypersensibilisierungsreaktion

Sieben Tage nach der letzten Immunisierung wurden intradermale Hauttests durchgeführt. 100 Mikroliter von 0.5% Evans blue (Sigma.St. Louis, Mo) wurden intravenös in die Schwanzvene der Mäuse injiziert. Daraufhin wurden 30 µl Bet v 1 oder Phl p 1 oder Phl p 5 (2,5 µg/ml) intradermal in die rasierte abdominale Haut injiziert. Die Mastzell-degranulierende Substanz 48/80 (20 µg/ml; Sigma) diente als positive Kontrolle und PBS wurde als negative Kontrolle genutzt. Nach 20 Minuten wurden die Mäuse getötet und die Farbintensität der Reaktion wurde mit der individuellen positiven Kontrolle an der Innenseite der Bauchhaut verglichen.

Probentnahme

Blutproben wurden vor und sieben Tage nach der Sensibilisierung aus den Schwanzvenen entnommen, das Serum wurde gewonnen und bei -20°C bis zur Analyse gelagert. Milzen wurden unter sterilen Bedingungen entnommen. Die Organe wurden homogenisiert und, durch sterile Filter gefiltert. Die Erythrozyten wurden lysiert und in einem Zellmedium (RPMI, 10% FCS, 0.1 mg/ml Gentamycin, 2 mmol/l Glutamin und 50 µmol/l 2-Mercaptoethanol) resuspendiert.

Detektion der Allergen-spezifischen Antikörper im Serum

Mikrotiterplatten (Nunc) wurden mit Bet v 1 (5 µg/ml), Phl p 1 (5 µg/ml) oder Phl p 5 (5 µg/ml) über Nacht bei 4°C beschichtet. Nach Waschung und Blockierung mit 1% BSA-PBS/Tween wurden Serumproben 1/1,000 für IgG1-, 1/500 für IgG2a- und 1/10 für IgE-Antikörper verdünnt. Ratten Anti-Maus IgG1, IgG2a und IgE Antikörper (1/500, Pharmingen, San Diego, Californien) und darauffolgend peroxidasekonjugierte Maus Anti-Ratten IgG-Antikörper (1/2000 Jackson Immuno Lab, West Grove, Pa.) wurden eingesetzt. Die Farbentwicklung ist wie früher beschrieben durchgeführt worden (Wiedermann et. al. 1999). Die Ergebnisse zeigen die OD-Werte nach Abzug der Grundwerte von preimmunem Serum.

Lymphozyten-Proliferationsassay

Die Milzzellsuspensionen wurden bei einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/Quelle auf 96 Platten (Nunc, Roskilde, Dänemark) ausplattiert und 4 Tage lang sowohl mit als auch ohne Concanvalin A (Con A; 0.5 µg/Quelle; Sigma), Bet v 1 (2 µg/Quelle) Phl p 1 (2 µg/Quelle) oder Phl p 5 (2 µg/Platte) stimuliert. Dann wurden die Kulturen mit 0.5 µCi/Quelle ^3H -Thymidin (Amersham, Buckinhamshire, UK) für 16 Stunden inkubiert. Die Proliferation wurde durch Szintillationszählung gemessen. Das Verhältnis der Proliferation nach Antigenstimulation (cpm) zur Proliferation nach Mediumbeigabe (cpm) wurde ermittelt (Stimulationsindex (SI)).

Die Epitopmapping

Um die immundominanten Peptide von Bet v 1, Phl p 1 und Phl p 5 lokalisieren zu können, wurde ein T-Zellepitopmapping durchgeführt. Es wurden Dodekapeptide, die jeweils in 3 Aminosäuren überlappen, verwendet, die die gesamte Sequenz der einzelnen Proteine überspannen. 50 Bet v 1 Peptide, 77 Phl p 1 Peptide und 92 Phl p 5 Peptide wurden mit Milzzellen von immunisierten Mäusen inkubiert und die Proliferationsraten nach Inkorporation von ^3H -Thymidin mittels eines Beta-Counters gemessen.

Messung der Zytokinproduktion

Für die Bestimmung der IFN- γ , IL-4-, IL-5- und IL-10-Produktion wurde die Milzzellsuspension mit oder ohne Con A (2.5 μ g/Platte), Birkenpollen (25 μ g/Platte) oder Phleumextrakt (25 μ g/Platte) in 48 Platten (Costar, Cambridge, Mass.) bei einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/Platte kultiviert. 40 Stunden später wurde der Überstand entnommen und bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

IL-4 und IL-10 Konzentrationen wurden mit Maus ELISA kits (Endogen, Cambridge, Mass.) gemessen. IFN- γ -Konzentrationen wurden folgendermaßen gemessen: Überstände wurden unverdünnt auf ELISA-Platten, die Anti-Maus-IFN- γ beschichtet waren, aufgetragen. Dann wurden Biotin-konjugierte Ratten Anti-Maus-IFN- γ Antikörper (0.1 μ g/ml, Endogen), gefolgt von Peroxidase-konjugiertem Streptavidin (1:10 000 in PBS/4% Rinderserumalbumin (BSA); Endogen) angewandt. Die Zytokinkonzentration lagen im pg/ml-Bereich.

Ergebnisse

Charakterisierung der Immunantworten auf Bet v 1, Phl p 1 und Phl p 5 in polysensibilisierten Mäusen

Allergenspezifische Antikörper und Typ I Hauttests: Polysensibilisierte Mäuse zeigten hohe IgG1 und IgE Antikörperanteile gegen alle drei Antigene. Bet v 1- und Phl p 1-spezifische IgG2a Antikörperkonzentrationen waren im Vergleich zur Phl p 5 spezifischen IgG2a Produktion (Fig. 1) geringer. Gemäß der erhöhten IgG1/IgE Antikörperkonzentration wiesen alle polysensibilisierten Mäuse starke Typ I -Hautreaktionen auf Bet v 1, Phl p 1 und Phl p 5 in vivo auf.

Lymphoproliferation von Milzzellen und Zytokinproduktion in vitro: Eine starke Lymphoproliferation wurde nach Stimulation mit allen 3 Antigenen beobachtet. Die T-Zellproliferation (SI) war am stärksten nach Stimulation mit Phl p 5 und vergleichbar stark nach Stimulation mit Bet v 1 und Phl p 1 (Tabelle 2). Zusätzlich wurde eine ausgeprägte IL-4, IL-5 und IFN- γ -Produktion festgestellt, nachdem die Milzzellsuspension von polysensibilisierten Mäusen mit Birkenpollen und Phleumextrakt stimuliert wurde (Tabelle 2). Naive Splenozyten, die mit Bet v 1, Phl p 1, Phl p 5, BP

oder Phleumextrakt behandelt wurden, unterschieden sich in ihrer Proliferationsantwort oder in der Zytokinantwort nicht von denen des Kontrollmediums, was die Antigen-spezifische Antwort von Milzzellkulturen von immunisierten Mäusen beweist (Daten nicht aufgeführt).

Epitopmapping: Um reaktive T-Zell-Epitope von Bet v 1, Phl p 1 und Phl p 5 festzustellen wurde die Milzzellsuspension von polysensibilisierten Mäusen mit den entsprechenden Peptiden stimuliert.

Für Bet v 1 (Zugangsnummer P15494) haben diese Experimente ein immundominantes T-Zell-Epitop MGETLLRAVESY beim C-Terminus gezeigt, entsprechend der Position 139-150 der Aminosäuresequenz, welche von Bauer et. al. beschrieben und veröffentlicht wurde. Weiterhin wurde das gleiche Epitop als immundominantes Peptid bei auf Birkenpollen allergischen Patienten identifiziert (Ebner et. al.).

Für Phl p 1 (Zugangsnummer P43213) wurde eine immundominante Region AGELELQFRRVKCKY identifiziert, die der Position 127-141 der Aminosäuresequenz entspricht. Diese Epitope wurden auch als T-Zell-reaktive Regionen bei menschlichen in vitro-Studien mit Phl p 1-spezifischen T-Zelllinien und T-Zellklonen beschrieben (Schenk, Ebner). Phl p 5 betreffend (Zugangsnummer Q40960) wurden zwei immundominante Regionen identifiziert, nämlich KVDAAFKVAATAANA, was der Aminosäuresequenz 166-180 entspricht, und TVATAPEVKYTVFETALK, welches der Aminosäuresequenz 226-243 entspricht. Die gleichen Sequenzen wurden vorher in menschlichen in vitro Studien mit Phl p 5-spezifischen T-Zelllinien und T-Zellklonen bei auf Gräser allergischen Patienten (Müller) beschrieben, was die klinische Bedeutung dieses Tiermodells belegt.

Diese Ergebnisse waren die Grundlage für die Synthese allergenspezifischer Peptide und eines Hybridpeptids, das aus den immundominanten Epitopen von Bet v 1, Phl p 1 und Phl p 5 (Tabelle 3) besteht. Folglich haben wir die Wirksamkeit einer Kombination der drei Allergene, einer Mischung der immundominanten Peptide oder des Hybridpeptids verglichen um mukosale Toleranz zur Verbindung von Polysensibilisierung zu induzieren.

Tabelle 2:

T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion in Milzzellkulturen von immunisierten Mäusen mit einer Zusammensetzung aus Bet v 1/Phl p 5 adsorbiert an Al(OH)₃.

	Bet v 1	Phl p 1	Phl p 5
SI	2.97 ± 0.51	2.63 ± 1.02	4.41 ± 2.38
	IFN- γ (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-5 (pg/ml)
BP	1933.3 ± 901.6	31.1 ± 16.59	51.7 ± 42.52
Phleum-Extrakt	1333.3 ± 288.7	41.2 ± 8.62	246.7 ± 105.1

Milzzellen von immunisierten Mäusen mit einer Zusammensetzung aus Bet v 1/Phl p 1/Phl p 5 wurden mit den entsprechenden Antigenen gezüchtet. Eine Proliferationsantwort wurde durch ³H-Inkorporation gemessen und als Stimulationsindex (SI) angegeben. IFN-γ, IL-4 und IL-5-Konzentrationen wurden in Überständen nach 40 Stunden Stimulation mit Birkenpollen (BP) oder Phleum-Extrakt mittels ELISA gemessen. Alle Ergebnisse sind Durchschnittswerte (± SD) aus drei unabhängigen Versuchen mit je fünf Tieren pro Experiment.

Tabelle 3:

PEPTIDE

Bet v 1 (Nr. 47): SKEMGETLLRAVESYLLAHSDE
Phl p 1 (Nr. 43/44): LRSAGELELQFRRVKCKYPEG
Phl p 5/1 (Nr. 56/57): VIEKVDAAFKVAATAANAAPANDK
Phl p 5/2 (Nr. 76/78): YAATVATAPEVKYTVFETALKKAI

HYBRID-PEPTID

1 12 27 45
MGETLLRAVESYAGELELOFRRVKCKYTVATAPEVKYTVFETALK

AA 1-12 Bet v 1 (Nr. 47)

AA 13-27 Phl p 1 (Nr. 43/44)

AA 28-45 Phl p 5/2 (Nr. 76/78)

Induktion von mukosaler Toleranz durch intranasale Coapplikation von Bet v 1, Phl p 1 und Phl p 5

Allergen-spezifische Antikörperkonzentrationen, Lymphoproliferationsantwort von Milzzellen und Zytokinproduktion in vivo: Die Coapplikation einer Mischung aus Bet v 1, Phl p 1 und Phl p 5 vor der Polysensibilisierung führte zu einer Abnahme der Bet v 1-spezifischen IgG1, IgE und IgG2a Konzentration im Vergleich zu den polysensibilisierten Kontrolltieren. Im Gegensatz dazu ist die Phl p 1- und Phl p 5-spezifische Antikörperproduktion eher angestiegen, besonders die Phl p 5-spezifische IgG2a Konzentration (Daten nicht aufgezeigt). Es wurde keine bedeutende Wirkung bezüglich der Proliferation von Milzzellen oder der allergenspezifischen Zytokinproduktion in vitro gezeigt (Daten nicht aufgezeigt). Daher wurde die Toleranzinduktion bei einer Mischung von immundominanten Peptiden oder eines Hybridpeptids mit immundominanten Peptiden aller drei Allergene durchgeführt.

Toleranzinduktion mit einer Mischung von immundominanten Peptiden im Vergleich zum Hybridpolypeptid

Allergenspezifische Antikörperkonzentration: Die intranasale Vorbehandlung mit der Peptidmischung sowie auch mit dem Hybridpeptid verringerte die Phl p 1-spezifische, jedoch nicht die Bet v 1- oder Phl p 5-spezifische IgG1-Produktion (Tabelle 4). Im Gegensatz dazu erhöhte sich die IgG2a-Konzentration wesentlich bei mit der Peptidmischung behandelten Mäusen (Tabelle 4A), gleichzeitig verringerte sich bei den polytolerisierten Mäusen das IgE/IgG2a Verhältnis für Bet v 1 und Phl p1-spezifische Antikörper um 60 % und um 30% für die Phl p 5-spezifischen Antikörper. Bei der intranasalen Anwendung des Hybridpeptids wurden ähnliche Ergebnisse bezüglich der IgG2a-Antikörperproduktion erzielt

(Tabelle 4B). Jedoch führte diese Vorbehandlung zu einer 80%-igen Abnahme der IgE/IgG2a Konzentration in Bet v 1-spezifischen, und zu einer 80%-igen Abnahme in Phl p 5-spezifischen Antikörperkonzentrationen im Vergleich zu den polysensibilisierten Kontrolltieren (Figur 2B).

Tabelle 4: Allergen-spezifische Antikörper in polysensibilisierten Sera im Vergleich zu poly-tolerisierten (A, poly-tol) oder Hybrid-tolerisierten (B, Hybrid-tol) Mäusen

A) Toleranzinduktion mit einer Peptidmischung

		IgG1 (OD)	IgE (OD)	IgG2a (OD)
Bet v 1	poly-sens	1.77 ± 0.48	0.71 ± 0.47	0.46 ± 0.29
	poly-tol	1.91 ± 0.16	0.61 ± 0.48	0.93 ± 0.69
Phl p 1	poly-sens	1.92 ± 0.51	0.23 ± 0.09	0.31 ± 0.10
	poly-tol	1.57 ± 0.43	0.32 ± 0.21	1.02 ± 0.77
Phl p 5	poly-sens	1.12 ± 0.02	0.48 ± 0.29	0.90 ± 0.42
	poly-tol	1.37 ± 0.37	0.59 ± 0.39	1.57 ± 0.46

B) Toleranzinduktion mit einem Hybridpeptid

		IgG1 (OD)	IgE (OD)	IgG2a (OD)
Bet v 1	poly-sens	2.11 ± 0.33	0.90 ± 0.69	0.18 ± 0.06
	poly-tol	2.29 ± 0.11	1.10 ± 0.88	1.04 ± 0.89
Phl p 1	poly-sens	1.93 ± 0.58	0.41 ± 0.11	0.43 ± 0.32
	poly-tol	1.87 ± 0.60	0.42 ± 0.32	1.08 ± 0.82
Phl p 5	poly-sens	1.31 ± 0.19	1.35 ± 0.53	0.55 ± 0.32
	poly-tol	1.57 ± 0.51	0.55 ± 0.25	1.07 ± 0.60

Poly-sensibilisiert: Durchschnittswerte (\pm SD) von fünf Mäusen mit einer Zusammensetzung aus Bet v 1/Phl p 1/Phl p 5 adsorbiert an $\text{Al}(\text{OH})_3$; poly-tolerisiert: Durchschnittswerte (\pm SD) von fünf Mäusen, vorbehandelt mit einer Zusammensetzung aus den immundominanten Peptiden von Bet v 1, Phl p 1 und Phl p 5; Hybrid-tolerisiert: Durchschnittswerte (\pm SD) von fünf Mäusen, vorbehandelt mit einem Hybridpeptid; OD = Optische Dichte.

Zytokinproduktion in vitro: Beide Vorbehandlungen führten zu einer bedeutenden Abschwächung der IL-4 und IL-10-Produktion in den polytolerisierten Tieren im Vergleich zu den polysensibilisierten Kontrolltieren (Figur 3). Im Gegensatz dazu erhöhten sich die IFN- γ -Konzentration beträchtlich (Figur 3). Nach der intranasalen Anwendung der Peptidmischung (BP: Polysensibilisierung 46.29 ± 21.11 pg/ml im Vergleich zu Polytoleranz 12.45 ± 8.10 pg/ml, $p < 0.05$; Phleumextrakt: Polysensibilisierung 272.86 ± 125.38 pg/ml im Vergleich zu Polytoleranz 78.84 ± 10.73 pg/ml, $p < 0.05$) wurde bei den Mäusen die IL-5-Produktion bedeutend abgeschwächt, jedoch nicht bei den mit dem Hybridpeptid vorbehandelten Mäusen (BP: Polysensibilisierung 25.82 ± 6.50 pg/ml im Vergleich zu Hybridtoleranz 17.24 ± 12.62 pg/ml; Phleumextrakt: Polysensibilisierung 146.46 ± 60.69 pg/ml im Vergleich zu Hybridtoleranz 178.63 ± 101.25 pg/ml).

Figur 1: Gleichzeitige Sensibilisierung mit den Rekombinanten Bet v 1, Phl p 1 und Phl p 5 führte zu einer vergleichbaren Antikörperantwort gegen alle drei Allergene. Dies zeigt, daß wir ein Model für Polysensibilisierung bei Mäusen aufgestellt haben. (vergl. Fig. 1).

Figur 2A und 2B: Folgen der Antikörperkonzentration gegen die drei Allergene nach intranasaler Toleranzinduktion der Peptidmischung (A) oder des Hybridpeptids (B). In beiden Fällen konnte eine Abnahme der Antikörperkonzentration erreicht werden. (vergl. Fig. 2A und 2B)

Figur 2A: Toleranzinduktion der Peptidmischung

Figur 2B: Toleranzinduktion des Hybridpeptids

Figur 3: Folgen der Toleranzinduktion der Peptidmischung (A) oder des Hybridpeptids (B) auf die Cytokinproduktion Interleukin 4 und Interleukin 10-Produktion hat sich erheblich nach der Behandlung sowohl mit der Peptidmischung als auch dem Hybridpeptid verringert. (verg. Fig. 3)

Ansprüche

1. Ein Hybridpolypeptid, umfassend eine Vielzahl von immundominanten T-Zell-Epitopen von Allergenen, wobei zwei von denen zumindest nicht miteinander kreuzreagieren.
2. Ein Hybridpolypeptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die T-Zell-Epitope von nicht miteinander kreuzreagierenden Allergenen stammen.
3. Ein Hybridpolypeptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Hybridpolypeptid die T-Zell-Epitope von Gräser- und Birkenpollenallergenen umfasst.
4. Ein Hybridpolypeptid nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Hybridpolypeptid die T-Zell-Epitope von Gräser-, Birkenpollen- und Latexallergenen und/oder Tierallergenen umfasst.
5. Ein Allergenchimär umfassend ein vollständiges Protein und zumindest ein weiteres Allergenfragment.
6. Ein Allergenchimär nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das vollständige Protein ein Bet v 1-Protein ist.
7. Ein Allergenchimär nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß das vollständige Protein und die Allergenfragmente nicht miteinander kreuzreagieren.
8. Ein Allergenchimär nach einem der Ansprüche 5-7, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Allergenfragmenten um T-Zell-Epitope handelt.
9. Ein Hybridpolypeptid nach einem der Ansprüche 1-4 oder ein Allergenchimär nach einem der Ansprüche 5-8, dadurch gekennzeichnet, daß durch das Hybridpolypeptid oder das Allergenchimär die Bildung von regulatorischen und/oder immunmodulatorisch wirksamen Zytokinen der unterbunden wird.

10. Ein Verfahren zur Herstellung von Hybridpolypeptiden nach einem der Ansprüche 1-4, 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridpolypeptide mittels chemischer Synthese hergestellt werden.
11. Ein Polynukleotid, welches das Allergenchimär nach Ansprüchen 6-9 codiert.
12. Ein Verfahren zur Herstellung eines Allergenchimärs nach einem der Ansprüche 5-9, umfassend die folgenden Schritte:
 - a) Bereitstellen eines Polynukleotids, welches das Allergenchimär codiert;
 - b) Einführen des Polynukleotids in eine Wirtszelle; und
 - c) Aufziehen der Wirtszelle unter solchen Bedingungen, daß diese das Allergenchimär exprimiert; und
 - d) Gewinnung der Expressionsprodukte von der Zelle.
13. Ein Verfahren nach Anspruch 12, worin die Polynukleotide, welche für das Allergenchimär codieren, durch PCR-Technik hergestellt werden.
14. Eine pharmazeutische Zusammensetzung umfassend ein Hybridpolypeptid nach einem der Ansprüche 1-4, 9 und/oder ein Allergenchimär nach einem der Ansprüche 5-9.
15. Eine pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 14, welche eine Vakzinzusammensetzung ist.
16. Verwendung der Hybridpolypeptide nach einem der Ansprüche 1-4, 9 und/oder der Allergenchimäre nach einem der Ansprüche 5-9 zur Herstellung eines Arzneimittels.
17. Verwendung der Hybridpolypeptide nach einem der Ansprüche 1-4, 9 und/oder der Allergenchimäre nach einem der Ansprüche 5-9 zur Herstellung einer Vakzine zur Behandlung allergischer Erkrankungen.

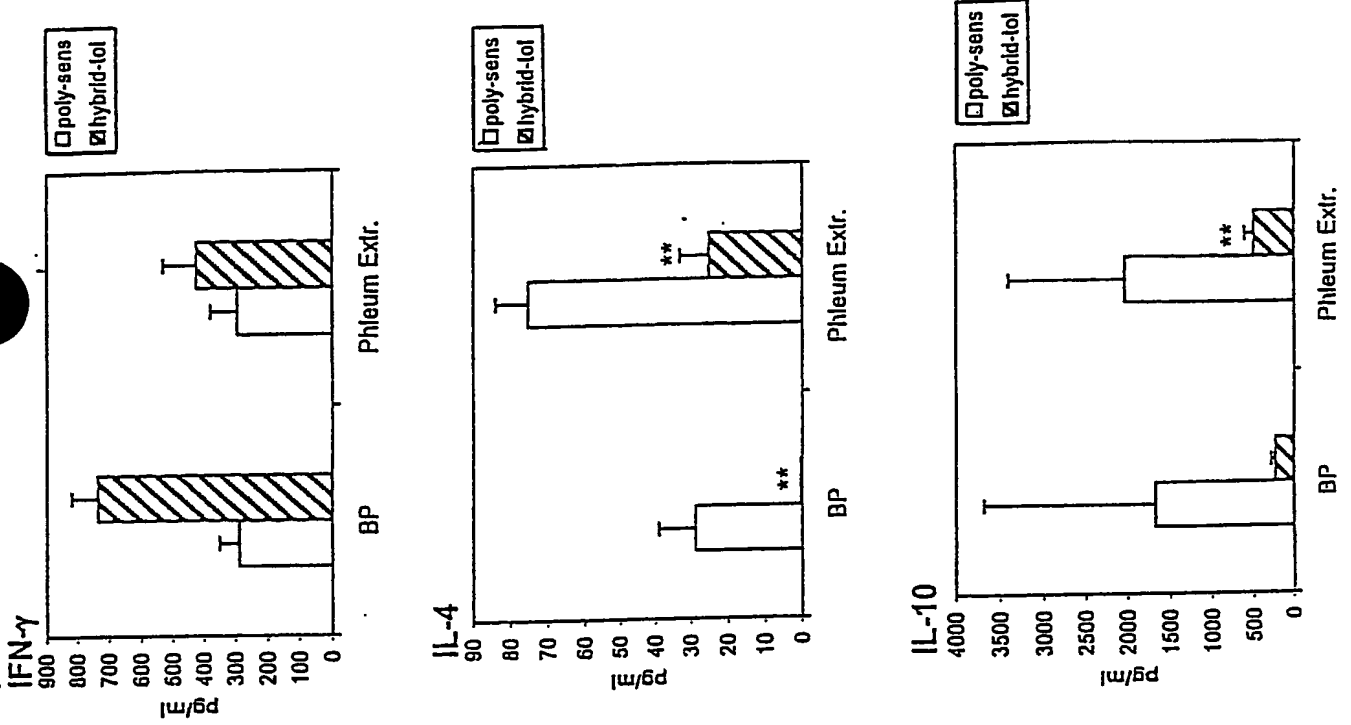
18. Verwendung von Hybridpolypeptiden nach einem der Ansprüche 1-4, 9 und/oder von Allergenchimären nach einem der Ansprüche 5-9, zur Herstellung einer Vakzine zur gleichzeitigen Behandlung von zumindest zwei verschiedener Allergien.
19. Verwendung nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß die verschiedenen Allergien durch nicht miteinander kreuzreagierende Allergene ausgelöst werden.
20. Verwendung nach den Ansprüchen 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Allergien um Birkenallergie und/oder Gräserpollenallergie und/oder Latexallergie und/oder Tierallergie handelt.
21. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 16-20, dadurch gekennzeichnet, daß die Vakzine nasal, oral oder rektal verabreicht werden kann.
22. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 16-20, dadurch gekennzeichnet, daß die Vakzine systemisch verabreicht werden kann.
23. Verwendung nach den Ansprüchen 16-20, dadurch gekennzeichnet, daß die Vakzine zur Prophylaxe und/oder Therapie von Polysensibilisierungen verwendet werden kann.
24. Verwendung nach den Ansprüchen 16-23, dadurch gekennzeichnet, daß die Vakzine ein mukosalen Adjuvans und/oder ein Antigentransportsystem, umfaßt.
25. Verwendung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Milchsäurebakterien das Antigentransportsystem sind.

Zusammenfassung

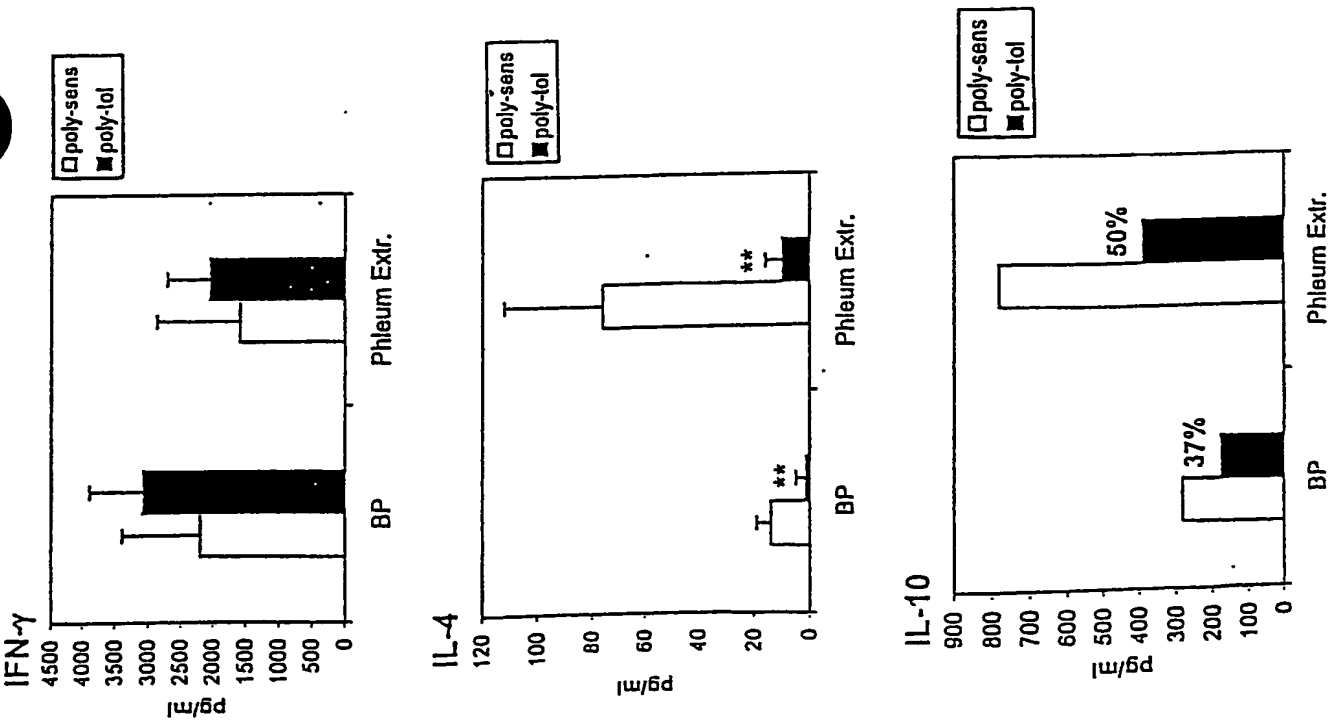
Polypeptide bestehend aus einer Vielzahl von immundominanten T-Zell-Epitopen von Allergenen, die geeignet sind, verschiedene Allergene gleichzeitig zu behandeln.

Fig. 3

B) Toleranzinduktion mit einem hybridpeptid



A) Toleranzinduktion mit einer Peptidmischung



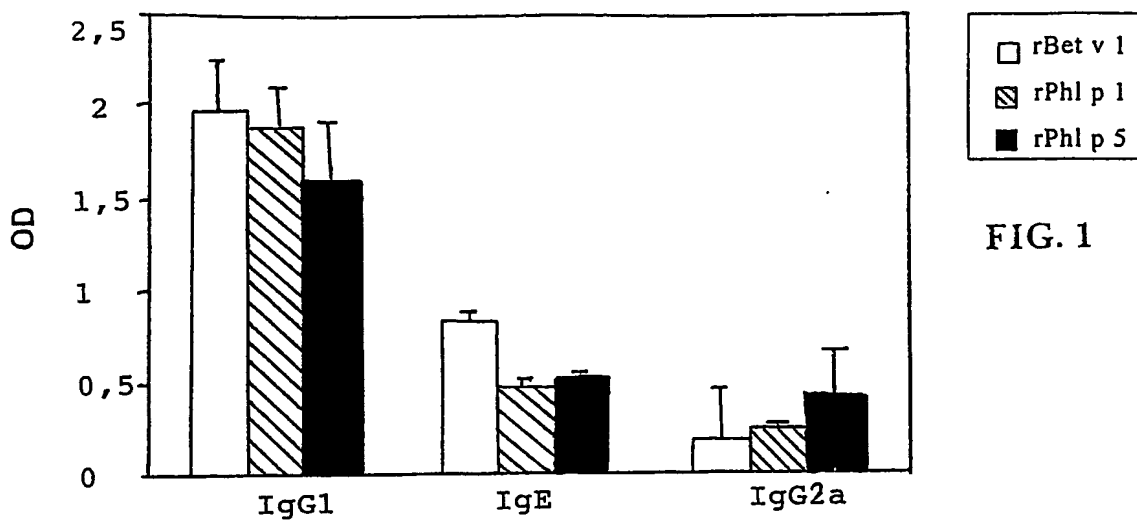


FIG. 1

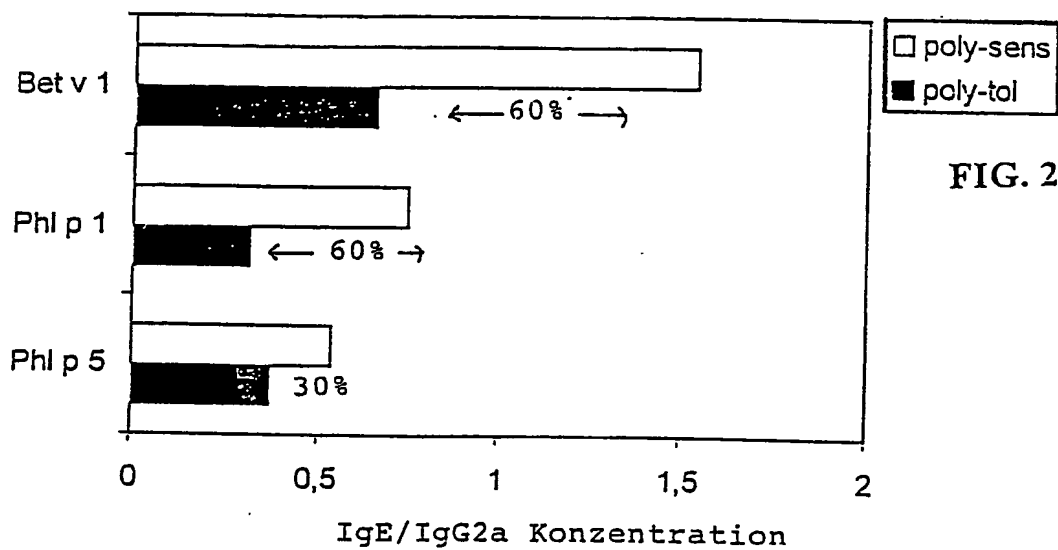


FIG. 2A

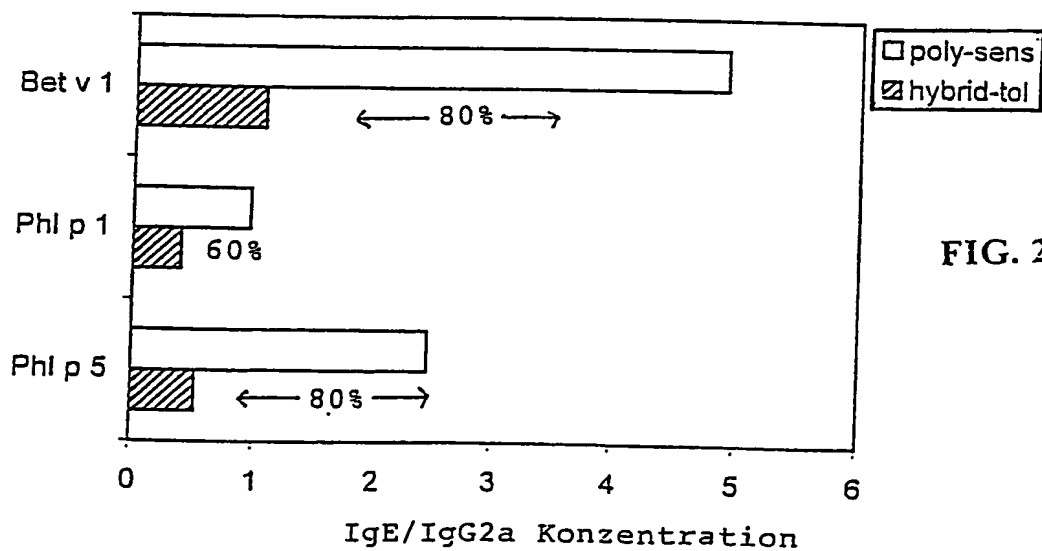


FIG. 2B

Application Project

<120> Title : Polyvalente Allergievakzine
<130> AppFileReference : K 39 161/7sc
<140> CurrentAppNumber :
<141> CurrentFilingDate : ____-__-__

Sequence

<213> OrganismName : Unknown
<400> PreSequenceString :
MGETLLRAVE SYAGELELQF RRVKCKYTVA TAPEVKYTVF ETALK
45
<212> Type : PRT
<211> Length : 45
SequenceName : Hybirdpolypeptid (page 6)
SequenceDescription :

Sequence

<213> OrganismName : Unknown
<400> PreSequenceString :
MEQKLRSAGE LELQFRRVKC KYPEGTKVEF GVFNYETETT SVIPAARLKA FILDGDNLFP
60
KVAPQAINIE GNGGPGTKIS PEGFPFKYVK DRVDEVDHTN FKYNYSVIEG GPIGDTLEKI
120
SNEIKIVATP DGGSILKISN KYHTKGDHEV KAEQVKASKE GETLRVESYL LAHSDAYNKL
180
QAYAATVATA PEVKYTVFET ALKKATAMSE
210
<212> Type : PRT
<211> Length : 210
SequenceName : Konstrukt 1 (Ph1 p 1 - Bet v 1a - Ph1 p 5) -
Aminosäuresequenz
SequenceDescription :

Sequence

<213> OrganismName : Unknown
<400> PreSequenceString :
MAYAATVATA PEVKYTVFET ALKKAITAMS EEFGVFNYET ETTSVIPAAAR LFKA FILDGD
60
NLFPKVAPQA ISSVENIEGN GPGTIKKIS FPEGFPFKYV KDRVDEVDHT NFKYNYSVIE
120
GGPIGDTLEK ISNEIKIVAT PDGGSILKIS NKYHTKGDHE VKAEQVKASK EMGETLLRAV
180
ESYLLAHSDA YNKLEQKLRS AGELELQFRR VKCKYPEGTK V
221
<212> Type : PRT
<211> Length : 221
SequenceName : Konstrukt 2 (Ph1 p 5 - Bet v 1a - Ph1 p 1) -
Aminosäuresequenz

SequenceDescription :

Sequence

<213> OrganismName : Unknown

<400> PreSequenceString :

MGEFGVFNYE TETTSVIPAA RLFKAFILDG DNLFPKVAPQ AISSVENIEG NGGPGTIKKI
60SFPEGFPFKY VKDRVDEVDH TNFKYNYSVI EGGPIGDTLE KISNEIKIVA TPDGGSILKI
120SNKYHTKGDH EVKAEQVKAS KEMGETLLRA VESYLLAHS D AYNKLEQKLR SAGELELQFR
180RVKCKYPEGT KVT SQAYAAT VATAPEVKYT VFETALKKAI TAMSE
225

<212> Type : PRT

<211> Length : 225

SequenceName : Konstrukt 3 (Bet v 1a - Phl p 1 - Phl p 5) -
minosäuresequenz

SequenceDescription :

Sequence

<213> OrganismName : Unknown

<400> PreSequenceString :

MEQKLRSAGE LELQFRRVKC KYPEGTKVTS QAYAATVATA PEVKYTVFET ALKKAITAMS
60EEFGVFNYET ETTSVIPAAR LFKAFILDGD NLFPKVAPQA ISSVENIEGN GGPGTIKKIS
120FPEGFPFKYV KDRVDEVDHT NFKYNYSVIE GGPIGDTLEK ISNEIKIVAT PDGGSILKIS
180NKYHTKGDHE VKAEQVKASK EMGETLLRAV ESYLLAHS DA YN
222

<212> Type : PRT

<211> Length : 222

SequenceName : Konstrukt 4 (Phl p 1 - Phl p 5 - Bet v 1a) -
minosäuresequenz

SequenceDescription :

Sequence

<213> OrganismName : Unknown

<400> PreSequenceString :

ccatggagca gaagctgcgc agcgccggcg agctggagct ccagttccgg cgcgtcaagt
60gcaagtaccc ggagggcacc aaggtggaat tcggtgtttt caattacgaa actgagacca
120cctctgttat ccagcagct cgactgttca aggcctttat ccttgatggc gataatctct
180ttccaaaggt tgcaccccaa gccattagca gtgttgaaaa cattgaagga aatggagggc
240ctggaaccat taagaagatc agctttcccg aaggcttccc tttcaagtac gtgaaggaca
300

K 39 161.WorkFile

gagttgatga ggtggaccac acaaacttca aatacaatta cagcgtgatc gagggcggtc
360
ccataggcga cacatggaga agatctccaa cgagataaag atagtggcaa cccctgatgg
420
aggatccatc ttgaagatca gcaacaagta ccacaccaaa ggtgaccatg aggtgaaggc
480
agagcaggtt aaggcaagta aagaaatggg cgagacactt ttgagggccg ttgagagcta
540
cctcttgga cactccgatg cctacaacaa gcttcaggcc tacgccgcca ccgtcgccac
600
cgcgccggag gtcaagtaca ctgtctttga gaccgactg aaaaaggcca tcaccgcat
660
gtccgaataa ctcgag
676

<212> Type : DNA

<211> Length : 676

SequenceName : Konstrukt 1 (Phl p 1 - Bet v 1a - Phl p 5) -
Nukleotidsequenz

SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Konstrukt 1 (Phl p 1 - Bet v 1a - Phl p 5) - Nukle
otidsequenz

Sequence

<213> OrganismName : Unknown

<400> PreSequenceString :

ccatggccta cgccgccacc gtcgccaccg cgccggaggt caagtacact gtctttgaga
60
ccgcactgaa aaaggccatc accgccatgt ccgaagaatt cggtgttttc aattacgaaa
120
ctgagaccac ctctgttata ccagcagctc gactgttcaa ggcctttata cttgatggcg
180
taatctctt tccaaagggt gcacccaag ccattagcag tgttgaaaac attgaaggaa
240
atggagggcc tggaaccatt aagaagatca gctttcccga aggcttcctt ttcaagtacg
300
tgaaggacag agttgatgag gtggaccaca caaacttcaa atacaattac agcgtgatcg
360
agggcggtcc cataggcgac acatggagaa gatctccaac gagataaaga tagtggcaac
420
ccctgatgga ggatccatct tgaagatcag caacaagtac cacaccaaaag gtgaccatga
480
ggtgaaggca gagcaggtta aggcaagtaa agaaatgggc gagacacttt tgagggccgt
540
tgagagctac ctcttggaac actccgatgc ctacaacaag cttgagcaga agctgcgcag
600
cgccggcgag ctggagctcc agttccggcg cgtcaagtgc aagtaccgag agggcaccaa
660
ggtgtaactc gag

673

<212> Type : DNA

<211> Length : 673

SequenceName : Konstrukt 2 (Phl p 5 - Bet v 1a - Phl p 1) -
Nukleotidsequenz

SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Konstrukt 2 (Phl p 5 - Bet v 1a - Phl p 1) - Nukle
otidsequenz

Sequence

<213> OrganismName : Unknown

<400> PreSequenceString :

ccatgggaga attcgggtgtt ttcaattacg aaactgagac cacctctgtt atcccagcag
60cgactgtt caaggccttt atccttgatg gcgataatct ctttccaaag gttgcacccc
120aagccattag cagtgttgaa aacattgaag gaaatggagg gcctggaacc attaagaaga
180tcagctttcc cgaaggcttc cttttcaagt acgtgaagga cagagttgat gaggtggacc
240acacaaactt caaatacaat tacagcgtga tcgagggcgg tcccataggc gacacatgga
300gaagatctcc aacgagataa agatagtggc aacccttgat ggaggatcca tcttgaagat
360cagcaacaag taccacacca aaggtgacca tgaggtgaag gcagagcagg ttaaggcaag
420taaagaaatg ggcgagacac ttttgagggc cgttgagagc tacctcttgg cacactccga
480tgcctacaac aagcttgagc agaagctgcg cagcgccggc gagctggagc tccagttccg
540gcgcgtcaag tgcaagtacc cggagggcac caaggtgact agtcaggcct acgccgccac
600gtcgccacc gcgccggagg tcaagtacac tgtctttgag accgcactga aaaaggccat
660caccgccatg tccgaataac tcgag
685

<212> Type : DNA

<211> Length : 685

SequenceName : Konstrukt 3 (Bet v 1a - Phl p 1 - Phl p 5) -
Nukleotidsequenz

SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Konstrukt 3 (Bet v 1a - Phl p 1 - Phl p 5) - Nukle
otidsequenz

Sequence

<213> OrganismName : Unknown

<400> PreSequenceString :

ccatggagca gaagctgcg agcgccggcg agctggagct ccagttccgg cgcgtcaagt
60gcaagtaccc ggagggcacc aaggtgacta gtcaggccta cgccgccacc gtcgccaccg
120cgccggaggt caagtacact gtctttgaga ccgcactgaa aaaggccatc accgccatgt
180ccgaagaatt cgggtgttttc aattacgaaa ctgagaccac ctctgttata ccagcagctc
240gactgttcaa ggcctttata cttgatggcg ataattctct tccaaagggt gcaccccaag
300ccattagcag tgttgaaaac attgaaggaa atggagggcc tggaaccatt aagaagatca
360gctttccga aggccttcct ttcaagtacg tgaaggacag agttgatgag gtggaccaca
420aaacttcaa atacaattac agcgtgatcg agggcgggtcc cataggcgac acatggagaa
480ctctccaac gagataaaga tagtggcaac ccctgatgga ggatccatct tgaagatcag
540caacaagtac cacaccaaag gtgaccatga ggtgaaggca gagcagggtta aggcaagtaa
600agaaatgggc gagacacttt tgagggccgt tgagagctac ctcttggcac actccgatgc
660ctacaactaa ctcgag
676

<212> Type : DNA

<211> Length : 676

SequenceName : Konstrukt 4 (Phl p 1 - Phl p 5 - Bet v 1a) -
Nukleotidsequenz

SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Konstrukt 4 (Phl p 1 - Phl p 5 - Bet v 1a) - Nukle
otidsequenz

Sequence

<213> OrganismName : Unknown

<400> PreSequenceString :

catgccatgg agcagaagct gcgcagc
27

<212> Type : DNA

<211> Length : 27

SequenceName : Construct 1: Pept 2 - Bet v 1a - Pept 4
(1a)

SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Construct 1: Pept 2 - Bet v 1a - Pept 4 (1a)

Sequence

<213> OrganismName : Unknown

<400> PreSequenceString :
atgaattcca ccttggtgcc ctccgg

26

<212> Type : DNA

<211> Length : 26

SequenceName : Construct 1: Pept 2 - Bet v 1a - Pept 4
(1b)

SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Construct 1: Pept 2 - Bet v 1a - Pept 4(1b)

Sequence

<213> OrganismName : Unknown

<400> PreSequenceString :
accaagcttc aggcctacgc cgccacc

27

<212> Type : DNA

<211> Length : 27

SequenceName : Construct 1: Pept 2 - Bet v 1a - Pept 4
(1c)

SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Construct 1: Pept 2 - Bet v 1a - Pept 4(1c)

Sequence

<213> OrganismName : Unknown

<400> PreSequenceString :
ccgctcgagt tattcggaca tggcgggtgat

30

<212> Type : DNA

<211> Length : 30

SequenceName : Construct 1: Pept 2 - Bet v 1a - Pept 4
(1d)

SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Construct 1: Pept 2 - Bet v 1a - Pept 4(1d)

Sequence

<213> OrganismName : Unknown
<400> PreSequenceString :
accaagcttg agcagaagct gcgcagc
27

<212> Type : DNA

<211> Length : 27

SequenceName : Construct 2: Pept 4 - Bet v 1a - Pept 2
(2a)

SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Construct 2: Pept 4 - Bet v 1a - Pept 2(2a)

Sequence

<213> OrganismName : Unknown
<400> PreSequenceString :
gctcgagt tacaccttgg tgccctccgg
30

<212> Type : DNA

<211> Length : 30

SequenceName : Construct 2: Pept 4 - Bet v 1a - Pept 2
(2b)

SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Construct 2: Pept 4 - Bet v 1a - Pept 2(2b)

Sequence

<213> OrganismName : Unknown
<400> PreSequenceString :
catgccatgg cctacgccgc caccgtc
27

<212> Type : DNA

<211> Length : 27

SequenceName : Construct 2: Pept 4 - Bet v 1a - Pept 2
(2c)

SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Construct 2: Pept 4 - Bet v 1a - Pept 2(2c)

Sequence

<213> OrganismName : Unknown
<400> PreSequenceString :
atgaattctt cggacatggc ggtgat
26

<212> Type : DNA
 <211> Length : 26
 SequenceName : Construct 2: Pept 4 - Bet v 1a - Pept 2
 (2d)
 SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Construct 2: Pept 4 - Bet v 1a - Pept 2(2d)

Sequence

<213> OrganismName : Unknown
 <400> PreSequenceString :
 accaagcttg agcagaagct gcgcagc
 27

<212> Type : DNA
 <211> Length : 27
 SequenceName : Construct 3: Bet v 1a - Pept 2 - Pept 4
 (3a)
 SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Construct 3: Bet v 1a - Pept 2 - Pept 4(3a)

Sequence

<213> OrganismName : Unknown
 <400> PreSequenceString :
 ggactagtca ccttggtgcc ctccgg
 26

<212> Type : DNA
 <211> Length : 26
 SequenceName : Construct 3: Bet v 1a - Pept 2 - Pept 4
 (3b)
 SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Construct 3: Bet v 1a - Pept 2 - Pept 4(3b)

Sequence

<213> OrganismName : Unknown
 <400> PreSequenceString :
 ggactagtca ggcctacgcc gccacc
 26

<212> Type : DNA
 <211> Length : 26
 SequenceName : Construct 3: Bet v 1a - Pept 2 - Pept 4
 (3c)

SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Construct 3: Bet v 1a - Pept 2 - Pept 4(3c)

Sequence

<213> OrganismName : Unknown

<400> PreSequenceString :

ccgctcgcagt tattcggaca tggcggatgat
30

<212> Type : DNA

<211> Length : 30

SequenceName : Construct 3: Bet v 1a - Pept 2 - Pept 4
(3d)

SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Construct 3: Bet v 1a - Pept 2 - Pept 4(3d)

Sequence

<213> OrganismName : Unknown

<400> PreSequenceString :

catgccatgg agcagaagct gcgcagc
27

<212> Type : DNA

<211> Length : 27

SequenceName : Construct 4: Pept 2 - Pept 4 - Bet v 1a
(4a)

SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Construct 4: Pept 2 - Pept 4 - Bet v 1a(4a)

Sequence

<213> OrganismName : Unknown

<400> PreSequenceString :

ggactagtca ccttggtgcc ctccggg
27

<212> Type : DNA

<211> Length : 27

SequenceName : Construct 4: Pept 2 - Pept 4 - Bet v 1a
(4b)

SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Construct 4: Pept 2 - Pept 4 - Bet v 1a(4b)

Sequence

<213> OrganismName : Unknown

<400> PreSequenceString :

ggactagtca ggcctacgcc gccacc

26

<212> Type : DNA

<211> Length : 26

SequenceName : Construct 4: Pept 2 - Pept 4 - Bet v 1a
(4c)

SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Construct 4: Pept 2 - Pept 4 - Bet v 1a(4c)

Sequence

<213> OrganismName : Unknown

<400> PreSequenceString :

atgaattctt cggacatggc ggtgat

26

<212> Type : DNA

<211> Length : 26

SequenceName : Construct 4: Pept 2 - Pept 4 - Bet v 1a
(4d)

SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Construct 4: Pept 2 - Pept 4 - Bet v 1a(4d)

Sequence

<213> OrganismName : Unknown

<400> PreSequenceString :

catgccatgg gagaattcgg tgttttcaat tacgaaactg

40

<212> Type : DNA

<211> Length : 40

SequenceName : Bet v 1a(5a)

SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Bet v 1a(5a)

Sequence

<213> OrganismName : Unknown

K 39 161.WorkFile

<400> PreSequenceString :
ccgctcgagt ccaagcttgt tgtaggcacg ggagtgtg
38

<212> Type : DNA

<211> Length : 38

SequenceName : Bet v 1a(5b)

SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Bet v 1a(5b)

Sequence

<213> OrganismName : Unknown

<400> PreSequenceString :

ccgctcgagt tagttgtagg catcggagtg
30

<212> Type : DNA

<211> Length : 30

SequenceName : Bet v 1a(5c)

SequenceDescription :

Custom Codon

Sequence Name : Bet v 1a(5c)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☒ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.